

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Köln

Direktor: Professor Dr. med. N. Schümmelfeder †

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
PRAKTISCHE ANWENDUNG DER FRIEDMAN – UND
V. BERTALANFFY – FÄRBETECHNIK BEI ZYTOLOGISCHEN
FÄRBUNGEN FÜR DIE FLUORESZENZMIKROSKOPIE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1969

vorgelegt von

Uta Krause geb. Heucke

aus Magdeburg

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Köln

Direktor: Prof. Dr. med. N. Schümmelfeder †

Vergleichende Untersuchungen über die
praktische Anwendung der Friedman - und
v. Bertalanffy - Färbetechnik bei zyto-
logischen Färbungen für die Fluoreszenz-
mikroskopie

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Uta Krause geb. Heucke

aus Magdeburg

Dekan: Prof. Dr. med. H. H. Naumann
Referent: Prof. Dr. med. H. Pickert
Korreferent: Prof. Dr. med. H.-J. Clemens



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 4. September 1969

Die Anfänge der Fluoreszenzmikroskopie gehen bis in das Jahr 1901 zurück. Damals konstruierte A. K ö h l e r ein Ultraviolettmikroskop und wies auf dessen Anwendungsbereich auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie hin. Etwa zehn Jahre später bauten R e i c h e r t in Wien und L e h m a n n (Zeiss/Jena) die ersten eigentlichen Fluoreszenzmikroskope. Erst allmählich erschienen im Verlauf der folgenden Jahre Arbeiten, in denen diese Fluoreszenzmikroskope zu Untersuchungen auf dem Gebiet der Mikrobiologie herangezogen worden waren und Verwendung gefunden hatten. Aus der Reihe der erschienenen Veröffentlichungen sollen hier nur einzelne kurz genannt werden. So beschrieb S t ü b e l 1911 primäre Fluoreszenzerscheinungen im ultravioletten Licht an tierischem Gewebe. 1914 berichtete W i l l s c h k e über die Fluoreszenz des pflanzlichen Farbstoffes Chlorophyll und 1921 erschien von K a i s e r l i n g eine Arbeit, in der erstmalig über die primäre Fluoreszenz von Bakterien berichtet wurde. 1932 untersuchten J a n s č o , F i s c h l und S c h w e n k lebende Protozoen und markierten sie intravital mit Fluorochromen. Einen ersten zusammenfassenden Bericht über Grundlagen zur Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzerscheinungen an verschiedenen Geweben veröffentlichte M. H a i - t i n g e r im Jahre 1934 in Abderhaldens Handbuch. Einen Beitrag zur Erweiterung der bakteriologischen Techniken gab H a g e m a n n in den Jahren 1937 und 1938 mit seinen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an fixierten Viren,

Tuberkel- und Leprabakterien. 1940 und 1941 berichteten S t r u g g e r , B u k a t s c h und H a i t i n g e r über den basischen Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange, mit dem sie an pflanzlichen Geweben arbeiteten und dessen Wirkungsweise insbesondere S t r u g g e r im einzelnen untersuchte und beschrieb.

Bei Anwendung von sauren und basischen Fluorochromen entstehen sekundäre Fluoreszenzfarben an bestimmten Zellstrukturen. Diese metachromatische Eigenschaft der Fluorochrome ist den herkömmlichen Farbstoffen nicht eigen. Darüber hinaus bietet die Möglichkeit einer sehr geringen Konzentration des Fluorochroms wesentliche Vorteile. Einerseits ist sie hoch genug, um eine kontrastreiche Vitalfärbung der Gewebe zu erzielen, andererseits so niedrig, daß die toxische Wirkung des Farbstoffes auf die Zellen im allgemeinen so klein wie möglich bleibt. Von der Wasserstoffionenkonzentration der Farbstofflösung sowie der des Mediums, in dem die zu untersuchenden Zellen suspendiert sind, ist die Aufnahme und Speicherung eines Fluorochroms weitgehend abhängig. Im dissoziierten Zustand, für Acridinorange z.B. im sauren Bereich (pH 2.04 - 6.48), sind die Kationen die färbenden Bestandteile des Fluorochroms. Je alkalischer die Acridinorangefarblösung wird, um so mehr geht die Dissoziation des Farbstoffes zurück. Die Fluoreszenzfarbe von Acridinorange im sauren Bereich ist ferner von der Farbstoffkonzentration abhängig, d.h. bei stark verdünnten Lösungen tritt eine grüne, bei konzentrierteren zunächst

eine gelbe, bei noch höher konzentrierten Farblösungen eine orange bis kupferrote Fluoreszenz auf (M. H a i t i n - g e r , Fluoreszenzmikroskopie 2. Aufl., Leipzig 1959).

In späteren Jahren wurden Versuche mit Acridinorange auch an tierischen Zellen und Geweben angestellt. Bereits in den Jahren 1948 - 1950 beschrieb S c h ü m m e l f e d e r bei Acridinorange - Fluorochromierung von Krebszellen eine auffallende, cytoplasmatische Rotfluoreszenz bei gelbgrün fluoreszierenden Kernen. Diese eindrucksvolle, metachromatische Eigenschaft des Acridinorange wurde 1957 vom gleichen Autor zusammen mit E b s c h n e r und K r o g h hinsichtlich ihrer Ursachen histochemisch untersucht.

S c h ü m m e l f e d e r , E b s c h n e r und K r o g h meinten, daß der Grad der Polymerisation der Ribonucleinsäure (RNS) in den Zellen verhältnismäßig niedrig, der der Desoxyribonucleinsäure (DNS) dagegen hoch sei. Die differente Fluorochromierung der Kern - DNS und der cytoplasmatischen RNS führten die Verff. auf diesen unterschiedlichen Polymerisationsgrad der beiden Zellbestandteile zurück. Wurde die Kern - DNS mit Salzsäure depolymerisiert und anschließend mit Acridinorange gefärbt, so fluoreszierten nun auch die Zellkerne kupferrot, ebenso wie das ribonucleinsäurehaltige Cytoplasma nicht vorbehandelter Zellen. Die Voraussetzung für die metachromatische Anfärbbarkeit von Kern und Plasma ist die Vitalfärbung oder aber eine vorangehende Fixierung, die den Polymerisationsgrad der Kern- und Cytoplasmanucleoproteide unbeeinflusst läßt.

Die Bindung des Acridinorange erfolgt an den freien Säuregruppen der RNS des Plasmas und der DNS des Kernes. Diese Bindung ist jedoch nicht spezifisch, da Acridinorange auch an andere saure Gruppen angelagert werden kann, z.B. an die der sauren Mucopolysaccharide, was sich aber gewöhnlich bei niedrigeren pH-Werten vollzieht. Eine endgültige Klärung dieses Problems steht jedoch noch aus. (Vgl. hierzu *)

Auf der Suche nach einem eindeutig kennzeichnenden Merkmal der Krebszelle im Gegensatz zu normalen Zellen wurde von zahlreichen Autoren der Versuch unternommen, auch die Fluoreszenzmikroskopie durch Fluorochromierung von Zellsuspensionen und Zellausstrichen in den Dienst der Früherkennung bösartiger Tumoren zu stellen, nachdem schon im Jahre 1950 Schümmelfeder und 1953 Flegel darauf hingewiesen hatten.

Im Jahre 1950 veröffentlichte Friedman als erster eine Arbeit über die Anwendung von Fluorochromen an gynäkologischem Abstrichmaterial. Er verwendete Berberinsulfat und Acridingelb in Verbindung mit Säurefuchsin. 1952 versuchten Mellors, Glasman und Papanicolaou auf photoelektrischem Wege die durch Fluorochromierung mit Berberinsulfat erzeugten Lichtintensitäten der hyperchromatischen Zellkerne oszillographisch aufzu-

* Suppl. Band 1, Acta histochemica 1958
Harms, Handbuch der Farbstoffe 1965

zeichnen. Um die subjektive Beurteilung der Fluoreszenzfarbintensitäten zu objektivieren, führten Meyer - Arendt, Rottmann und v. Schweinitz 1955 ein quantitatives Meßverfahren ein. Bei seinen Untersuchungen über die Bedeutung der Nucleinsäuren in der Carcinogenese entwickelte v. Bertalanffy und Mitarb. 1956 die noch heute gebräuchliche Technik der Acridinorange-Fluorochromierung und wies in mehreren Arbeiten auf ihre Vorteile im Vergleich zu anderen Methoden hin. Er legte insbesondere Nachdruck auf die auffallende Rotfluoreszenz des Cytoplasmas der Tumorzellen, deren Ursache wegen der erhöhten Proteinsynthese innerhalb der Carcinomzellen in einem gesteigerten RNS-Gehalt zu suchen ist und die als eindeutiges "Warnungssignal" für Tumorzellen zu werten sei. Diese neue Methode wurde von zahlreichen Autoren aufgegriffen und vor allem ihre Vor- sowie Nachteile im Vergleich zur Papanicolaou - Färbetechnik aufgezeigt (*).

Dart und Turner (1959) legten wie v. Bertalanffy selbst Gewicht auf die Treffsicherheit der Diagnosestellung und waren mit ihm der Ansicht, daß diese Methode geeignet wäre, selbst ungeübten Untersuchern, allein auf Grund der cytoplasmatischen Rotfluoreszenz der Carcinomzellen, die Vorauswahl der tumorverdächtigen Präparate über-

* Dart und Turner 1959; Sussman 1959; Umicker, Pickle und Wait 1959; Bontke, Kern und Schümmelfeder 1960; Kern, Schümmelfeder und Kern-Bontke 1961; Culling und Vassar 1961; Liu 1961; Schümmelfeder, Kern und Kern-Bontke 1962; Wellmann 1962; Wied und Mangano 1962; Wellmann, Mc Dermott und Gray 1963;

lassen zu können und so im umfangreichen Routinebetrieb geschulte Kräfte zu entlasten. Eine Einschränkung der Zuverlässigkeit des Verfahrens erfolge dadurch nicht. Ebenso stimmte S u s s m a n (1959) den Ansichten von v. B e r t a - l a n f f y zu. Andere Autoren *) betonten zwar auch die Vorteile der Methode, wie kurze Färbezeit, leichte Ausführung und sicheres Gelingen der Färbung sowie Erzielung guter, "polychromatischer" Zellbilder, wiesen aber außerdem besonders auf die Bedeutung und erforderlichen Kenntnisse der morphologischen Details der Zellen hin, die eine sichere Diagnosestellung erst ermöglichen und die ein "Vorauswahlverfahren" ("prescreening method") durch ungeschultes Personal nicht zulassen. F l e g e l berichtete schon 1953, daß cytoplasmatische Rotfluoreszenz nicht allein für Tumorzellen charakteristisch sei. Seine Ansicht bestätigten insbesondere K e r n , S c h ü m m e l f e d e r und K e r n - B o n t k e 1961, die an gynäkologischen Zellabstrichen von Carcinoma in situ und Collumcarcinomen sowohl Rotfluoreszenz an normalen Zellen beobachteten als auch bei morphologisch sicheren Krebszellen rotfluoreszierendes Cytoplasma vermißten. Zusammenfassend sei gesagt, daß die Mehrzahl der Autoren der Ansicht ist, die Acridinorange-Fluorochromierung könne zwar nicht die Cytodiagnostik nach P a p a - n i c o l a o u ersetzen und sei in der Form der Krebszellen-Vorauswahl nicht zuverlässig, daß sie aber neben anderen Verfahren angewendet werden sollte und gute Dienste leisten könne.

* Umicker, Pickle und Wait 1959; Schümmelfeder, Kern und Kern-Bontke 1960; 1961; 1962; Wellmann 1962; Wied und Mangano 1962;

Eine andere Färbemethode mit Fluorochromen entwickelte und veröffentlichte H.P. F r i e d m a n 1950. Diese Arbeit wurde von einigen Autoren erwähnt (*). Über den diagnostischen Wert und die Anwendung dieser Färbetechnik finden sich aber bisher keine zureichenden Angaben in der Literatur.

F r i e d m a n untersuchte 25 Fluoreszenzfärbungen mit verschiedenen Fluorochromkombinationen bei unterschiedlichen Wasserstoffionenkonzentrationen der Farblösungen. Er hielt die Verbindung von neutralem Berberinsulfat, Säurefuchsin und Acridingelb am geeignetsten, eine gute Differenzierung der Kern- und Plasmastrukturen zu bewirken. F r i e d m a n selbst beschrieb die Art der Anfärbbarkeit der Zellbestandteile durch die verschiedenen, verwendeten Farbstoffe folgendermaßen:

"Säurefuchsin, ein Triphenylmethanfarbstoff, verursacht an bestimmten Zellen eine purpurrote cytoplasmatische Fluoreszenz, Berberinsulfat, ein basisches Fluorochrom, eine helleuchtend gelbweiße Kernfluoreszenz, während Acridingelb die Kerne mancher Zellen mit einem grüngrauen Farbton überlagert und dem Cytoplasma eine orange-rote bis braune Anfärbung verleiht".

Voraussetzung für die beschriebene Wirkungsweise der Farbstoffe war eine Wasserstoffionenkonzentration von 8,0. F r i e d m a n gab nicht nur die Färbetechnik an, sondern untersuchte auch die verschiedenen Zelltypen

* Mellors, Glasman und Papanicolaou 1952; Fuhrmann 1955; Schümmelfeder 1962; Wied und Mangano 1962;

von Vaginalabstrichen karzinomfreier Patientinnen. Er beschrieb die unterschiedlichen morphologischen Charakteristika der einzelnen Zelltypen sowie die zu beobachtenden Farbtöne. Auch wurde die Darstellung und das Bild der Bakterien der Vaginalflora nach der fluoreszenzmikroskopischen Färbung beschrieben. Die Zellen aus den verschiedensten Zellschichten wiesen Kerne mit gelb- und grünweißer sowie gelbgrüner Fluoreszenz auf, während das Cytoplasma der Zellen orange- bis rotbraun oder mehr grünbraun fluoreszierte. Über die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Carcinomzellen kündigt F r i e d m a n eine Veröffentlichung zu späterem Zeitpunkt an, die aber bisher nicht erschienen ist. In dieser ersten Arbeit (1950) macht er

darüber nur eine kurzgefaßte Mitteilung: Da Krebszellen eine oft gesteigerte Basophilie aufweisen und infolgedessen in der Lage sind, höhere Mengen basischer Fluorochrome aufzunehmen, muß sich daher die Qualität der Fluoreszenz zwangsläufig ändern. Tumorzellen fluoreszieren heller als die normalen, von denen sie abstammen, d.h. die hyperchromatischen, basophilen Kerne zeigen ein deutliches Chromatingerüst neben einem leuchtend orange fluoreszierenden Nucleolus; das Cytoplasma der Carcinomzellen fluoresziert heller orange-farben.

Da die Eignung von Acridinorange für cytologische Untersuchungen bereits vielfach bestätigt worden ist, habe ich versucht, unabhängig von ihrem diagnostischen Wert die Verfahren, die von F r i e d m a n und von v. B e r t a l a n f f y angegeben wurden, hinsichtlich ihrer Färbegualitäten zu vergleichen, um zu der Frage Stellung nehmen zu können, ob die F r i e d m a n - Färbung im Vergleich zur Acridinorange-Fluorochromierung möglicherweise Vorteile

bietet und der Technik nach v. B e r t a l a n f f y
überlegen ist.

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurden die einzel-
nen Färbeschritte der F r i e d m a n - Färbung geprüft
und die Wirkungsweise der unterschiedlichen Farbstoffe
einzeln und untereinander kombiniert untersucht.

Bei der Acridinorange-Fluorochromierung nach v. B e r -
t a l a n f f y beschäftigte mich die Frage, welche Art
der Vorbehandlung der Präparate am geeignetsten ist, um
noch gute, farbkraftige Fluoreszenzbilder zu erzielen.

Außerdem wurde geprüft, welche Art der Eindeckung der
gefärbten Ausstriche bei der Acridinorangegefärbung am
besten ist.

Ferner wurde die Güte der Umfärbung acridinorangegefärb-
ter Ausstriche mit Haematoxylin-Eosin und mit der Färbe-
technik nach P a p a n i c o l a o u untersucht.

MATERIAL und METHODEN

I. Material

Ich verwendete normale Mundschleimhautepithelien, Ascitesflüssigkeit von Ascitesbildenden Tumoren bei der Maus (Ehrlich-Tumor, M Ca 1 und Ehrlich Tetraploid) sowie Stauungs- und carcinomatöse Ergüsse vom Sektionsmaterial; letztere wurden bei 1000 - 1500 Umdrehungen/min 10 min zentrifugiert und die Zellsuspension mit einem Deckglas auf dem Objektträger ausgestrichen. Aus der Mundhöhle wurden mit einem Spatel Abstriche durchgeführt und das Material mit einer Oese ausgestrichen, Ascites von Tumoren der Maus wurde, gewöhnlich nicht vor dem 8.- 10. Tag nach Überimpfung der Tumoren, mit einer Spritze entnommen, nicht zentrifugiert und unmittelbar nach der Entnahme mit einem Deckglas auf Objektträgern verteilt.

II. Methoden

I. Färbung nach F r i e d m a n (Originalrezept):

- 1) Unmittelbar nach dem Ausstreichen des zu untersuchenden Materials Fixierung in einem Gemisch von gleichen Teilen Diäthyläther und 96 proz. Äthylalkohol (15 min bis unbegrenzte Zeit).
- 2) Absteigende Alkoholreihe (70 und 50 proz. Isopropylalkohol und Aqua dest.), 5 mal in jeder Lösung spülen.
- 3) 0,5 proz. Salzsäure und Aqua dest. 5 mal in beiden Lösungen spülen.

- 4) 5 mal spülen in Säurefuchsinlösung (1 ml Stammlösung auf 2000 ml Aqua dest.) und sofort 4 min in Säurefuchsinlösung (1 ml Stammlösung auf 1000 ml Aqua dest.) stellen.
- 5) 4 min färben in Acridingelblösung (1 g auf 1000 ml), anschließend 5 mal in destilliertem Wasser spülen.
- 6) 45 sec Einstellen der Ausstriche in eine pH 8.0 Pufferlösung (M/5 Kaliumdihydrogenphosphat und M/5 Natriumhydroxyd).
- 7) Die gefärbten Bezirke sofort mit 3 Tropfen einer Lösung aus 100 mg Berberinsulfat, 200 mg Säurefuchsin und 100 mg Acridingelb in einer Mischung von 100 ml Pufferlösung pH 8.0 und 400 ml Glyzerin bideest. wasserfrei (= "glycerin compound") bedecken, nach 3 - 4 min 1 Tropfen Berberinsulfat zugeben und ein Deckglas drauflegen.
- 8) Versiegelung des Deckglases mit Nagellack.

Versuchsanordnung 1: Farbstoffe verschiedener Firmen

Ich verwendete zunächst die mir leicht zugänglichen Farbstoffe:

Berberinsulfat

Säurefuchsin (Rubin S) Fa. Merck/Darmstadt

Acridingelb Fa. Gurr/London

Später kamen die Originalfarbstoffe, die

F r i e d m a n in seiner Veröffentlichung angab, zur Anwendung:

Berberinsulfat Fa. Merck/Darmstadt

Acridingelb Fa. Chroma/Stuttgart
früher Grübler/Leipzig

Säurefuchsin National Aniline/New York

Folgende Bezeichnungen wurden gewählt:

Friedman I : keine Originalfarbstoffe

Friedman II : Originalfarbstoffe

Versuchsanordnung 5: Kombination bzw. Auslassen einzelner Punkte des Originalrezeptes nach F r i e d m a n

Bei der Überprüfung der einzelnen Färbeschritte verwendete ich Mundschleimhautepithelien. Der Fixierungsvorgang war bei allen durchgeführten Untersuchungen einheitlich (s. Punkt 1) und 2) des Originalrezeptes nach F r i e d m a n , Seite 11).

II. Färbung nach v. B e r t a l a n f f y

(Originalrezept):

- 1) Fixierung der Ausstriche sofort nach ihrer Gewinnung in einem Gemisch von gleichen Teilen Diäthyläther und Äthylalkohol (96 proz.) 1 Std. bis unbegrenzte Zeit.
- 2) Absteigende Alkoholreihe (80 - 70 - 50 proz. Isopropylalkohol) und Aqua dest.
- 3) 5 min 1 proz. Essigsäure, 2 mal wechseln.
- 4) Spülen in destilliertem Wasser.
- 5) 3 min färben in Acridinorangelösung (0,01 proz. Acridinorange in Phosphatpuffer M/15, pH 6.0 nach Sörensen; Acridinorange der Fa. Bayer/Leverkusen).
- 6) 1 min spülen in farbfreiem Phosphatpuffer pH 6.0
- 7) 30 sec. bis 1 min differenzieren in 0.1 M Calciumchloridlösung bis die Kernstruktur deutlich abgrenzbar ist (unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrollieren).
- 8) Spülen in farbfreiem Phosphatpuffer, pH 6.0 und Eindecken der Präparate in der gleichen Pufferlösung.
- 9) Versiegelung des Deckglases mit Nagellack.

Versuchsanordnung 6: Unterschiedliche Vorbehandlung der Methode und Hinzunahme eines Zeitfaktors im Vergleich zum Originalrezept nach v. B e r t a l a n f f y

Gewählt wurde einheitliches Material; 20 Versuchsreihen wurden durchgeführt.

Die Hälfte der Ausstriche wurde am gleichen Tage gefärbt, wobei im Vergleich zum Originalrezept lediglich unterschiedliche Fixierungsvorgänge, wie im folgenden aufgeführt, berücksichtigt wurden:

- a) Durchführung von Fixierung und Färbung nach Originalrezept
- b) Zwischenzeitliche Einschaltung von Lufttrocknung (4 - 6 Std.) nach Äther-Alkohol-Fix.
- c) Ausschließliche Lufttrocknung (4 - 6 Std.) ohne Äther-Alkohol-Fix.
- d) Lufttrocknung (4 - 6 Std.) vor Äther-Alkohol-Fix.

Für die restlichen Ausstriche kam zur ebenfalls abgewandelten Fixierung zusätzlich ein Zeitfaktor hinzu, der sich auf 14 Tage erstreckte. Bei diesen Präparaten wurde erst nach Ablauf dieser Zeitspanne der Färbevorgang nach Originalrezept durchgeführt.

- e) 14 Tage Lufttrocknung, anschließend Originalrezept
- f) 14 Tage Lufttrocknung nach Äther-Alkohol-Fix.
- g) Lufttrocknung 1 Std. Anschließend 14 Tage Aufbewahrung, wobei jeweils 2 Objektträger mit Glyzerin bedeckt und die beschickten Seiten aufeinander gelegt wurden.
- h) Anfixierung in Äther-Alkohol, anschließend 14 Tage Aufbewahrung, wie unter g) beschrieben.

Versuchsanordnung 7: Verschiedene Einschlußmittel

Im Vergleich zur Puffereindeckung (Originalrezept) wurde die Eindeckung der gefärbten Ausstriche mit reinem doppelt destillierten Glyzerin vorgenommen und ihre Haltbarkeit untersucht.

In diesem Untersuchungsang wurden 30 Vergleiche angestellt.

Versuchsanordnung 8: Unterschiedliche Aufbewahrung der gefärbten Präparate

Die nach v. B e r t a l a n f y gefärbten Ausstriche wurden bei Zimmertemperatur im abgedunkelten Raum und im Kühlschrank bei + 4° C bis zu 14 Tagen aufbewahrt, anschließend ihre Haltbarkeit vergleichend untersucht.

Versuchsanordnung 9: Umfärbung acridinorangefluorochromierter Ausstriche und Zeitfaktor

Die Umfärbung der fluorchromierten Ausstriche wurde mit Haematoxylin-Eosin und nach P a p a n i c o - l a o u vorgenommen. Der Zeitfaktor wurde insofern berücksichtigt, da die Fluorchromierung bei Umfärbung unterschiedlich lange zurück lag:

14 Tage, 8, 3 Tage, 1 Tag
und unmittelbar nach AO-Färbung

Wegen der unterschiedlich langen Aufbewahrungszeit der fluorchromierten Präparate und der beabsichtigten gleichzeitigen Umfärbung konnte nur Material

Verwendung finden, das jederzeit zur Verfügung stand.
Diese Voraussetzung war bei Ascitesflüssigkeit von
Tumoren bei der Maus gegeben.

Vorgegangen wurde wie folgt:

Färbung nach v. B e r t a l a n f f y (Originalrezept) und Beurteilung der Ausstriche im
Fluoreszenzmikroskop

Ablösen der versiegelten Deckgläser

Einstellen in Pufferlösung pH 6.0

Durchführen durch aufsteigende Alkoholreihe
(50 - 70 - 80 proz. Äthylalkohol) in Äther-
Alkohol

Umfärbung mit Haematoxylin-Eosin und nach
P a p a n i c o l a o u

Färbung mit Haematoxylin-Eosin:

- 1) Durchführen der Präparate durch die absteigende
Alkoholreihe (absol. Äthanol 2 mal, 96 proz.
Äthanol 2 mal und 70 proz. Isopropylalkohol).
- 2) 10 min färben in wässrigem Haemalaun nach Mayer
- 3) 10 min Einstellen der Präparate in Leitungswasser
(mehrere Male wechseln).
- 4) 5 min färben in Eosinlösung (Eosin gelblich der
Fa. Merck/Darmstadt).
- 5) kurz in Leitungswasser abspülen.
- 6) Durchführen durch die aufsteigende Alkoholreihe
(70 proz. Isopropylalkohol, 2 mal 96 proz. Äthanol
und 2 mal absol. Äthanol) über Karbolxylol in
Xylol.
- 7) Eindecken der Präparate mit Eukitt.

Färbung nach P a p a n i c o l a o u : (Farblösungen der Fa. Merck/Darmstadt)

- 1) Äther-Alkohol-Fixation (1 Std.; Diäthyläther und
96 proz. Diäthylalkohol zu gleichen Teilen).
- 2) Durchführen der Ausstriche durch die absteigende
Alkoholreihe (96 - 80 - 70 und 50 proz. Isopropylalkohol).
- 3) 2 min färben in Haematoxylinlösung nach Harris.
- 4) 10 min Einstellen der Präparate in Leitungswasser
(mehrere Male wechseln).

- 5) Aufsteigende Alkoholreihe (50 - 70 - 80 - 96 proz. Alkohol).
- 6) 2 min färben in Orange G-Lösung.
- 7) Durchführen der Ausstriche durch 3 Gefäße mit 96 proz. Äthanol.
- 8) 1 min färben in Pelychromlösung EA 50.
- 9) Durchführen der Präparate durch 2 Gefäße mit 96 proz. Äthanol und 5 min Einstellen in absoluten Äthanol.
- 10) 10 min Einstellen der Präparate in eine Mischung von absolutem Äthanol und Xylol zu gleichen Teilen.
- 11) Einstellen der Ausstriche in Xylol (mehrere Male wechseln).
- 12) Eindecken der Präparate mit Eukitt.

III. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung der gefärbten Ausstriche stand mir ein Ortholux-Mikroskop der Fa. E. Leitz/Wetzlar zur Verfügung, das mit einer Quecksilber-Höchst-Druck-Lampe C S 150 der Fa. Philips ausgerüstet war. Als ultraviolett-durchlässige Filter an der Lampe wurden für die UV-Fluoreszenzmikroskopie 2 oder 4 mm starke Filter Schott UG 1 verwendet. Der nicht zur Fluoreszenzerzeugung benötigte Anteil der Erregerstrahlung wurde durch Okularsperrfilter (Euphos-Gläser) absorbiert, die jedoch für das ausgesendete Fluoreszenzlicht durchlässig waren.

Bei der Blaulicht-Fluoreszenzmikroskopie verwendete ich als blaulichtdurchlässige Filter an der Lampe Schott

BG 12, 2 mal 4 mm und als Okularsperrfilter OG 1, in 2,5 mm Stärke. Zwischen Lampe und Mikroskopkondensor diente eine 13 mm-Quarzglasküvette, die mit 10 proz. Kupfersulfatlösung gefüllt war, zur Kühlung sowie zur Rotabsorption.

ERGEBNISSE

Anhand der von mir durchgeführten Untersuchungen sowohl an normalen als auch an pathologischen Zellen, war es mir in keinem Fall möglich, Ergebnisse zu erhalten, wie sie von F r i e d m a n 1950 angegeben wurden.

Bei der 1. Versuchsanordnung (S.12) beinhaltend F r i e d m a n I und II, erreichte ich zwar eine Fluorochromierung der Zellen, eine Differenzierung von Kern und Plasma war jedoch unmöglich, da die Fluoreszenzfarben innerhalb der Zellen keine Differenzen aufwiesen. Kerne und Plasma fluoreszierten in der gleichen Farbe. Es fanden sich Grün-, Gelb- und Orangefarbtöne, rot oder purpurrot fluoreszierendes Cytoplasma, wie es F r i e d m a n gesehen hat, wurde in keinem Fall beobachtet. Die Kerngrenzen der auf diese Art fluorchromierten Zellen waren immer undeutlich bis aufgehoben, die Zellgrenzen nicht in allen Versuchen scharf abgrenzbar.

Für die 2. Versuchsanordnung (S.13) mit F r i e d m a n III und IV gelten die oben aufgeführten Ergebnisse in gleicher Weise hinsichtlich schlechter Beurteilbarkeit der einzelnen morphologischen Zellbestandteile. Es ließen sich lediglich langwelligere (hell- und dunkel-rotorange) Fluoreszenzfarben feststellen.

Aufgrund der von mir durchgeführten Untersuchungen, die zeigten, daß die Ergebnisse von F r i e d m a n mit

seiner Originalfärbung nicht reproduzierbar waren, wurde in der Versuchsanordnung 3 (S. 13) eine weitere Abwandlung des Originalrezeptes hinsichtlich der Einschlußmittel vorgenommen. Dabei bewirkte reines Glycerin lediglich eine Aufhellung des Untergrundes im mikroskopischen Bild und damit eher eine unerwünschte Nivellierung der Farbkontraste zwischen Zellen und Untergrund. Reine pH 8-Pufferlösung als Eindeckmittel zeigte jedoch im Vergleich zum Originalrezept und zu reinem Glycerin einige Vorteile:

- 1.) Bei Friedman I und II wurden die Kerne etwas besser abgrenzbar.
- 2.) Bei Friedman III und IV waren gute bis sehr gute Kerndarstellungen vorhanden.
Zusätzlich trat eine Metachromasie auf:
blau-grüne Kern- und orange Plasmafluoreszenz.

Das gleiche Material wie bei Versuchsanordnung 1 - 3 kam in der 4. Versuchsanordnung (S. 13) zur Anwendung.

Die nach dem Originalrezept von v. B e r t a l a n f f y gefärbten Tumorzellen zeigten in allen Fällen die charakteristische "Rot-Grünfluoreszenz":

Gut abgrenzbare, hellgelbgrünfluoreszierende Kerne fanden sich bei orangerotfluoreszierendem Cytoplasma.

Aus dem untersuchten Material der Versuchsanordnungen 1 - 4 wurden Zellen des Ehrlich-Ascitestumors als Beispiel ausgewählt und die oben aufgeführten Ergebnisse stichwortartig und übersichtlich in einer Tabelle dargestellt.

Eindeckmittel:

<u>Färbevorgänge:</u>	a) nach Vorschrift Kern	Plasma	b) pH 8.0 Kern	Plasma	c) reines Glycerin Kern	Plasma
Friedman I	gelbgrün Undeutliche Kerngrenzen	grün	gelbgrün Kerngrenzen etwas deutlicher als a) und c)	grün	gelbgrün Untergrund heller als a) und b)	grün
Friedman II	bräunl. orange Undeutliche Kerngrenzen	gelb-orange Kerngrenzen etwas deutlicher als a) und c)	bräunl. orange Kerngrenzen etwas deutlicher als a) und c)	gelb-orange	bräunl. orange Zellen und Untergrund heller als a) und b)	gelb-orange
Friedman III	dunkelrotorange Kerngrenzen nicht sichtbar	dunkelrotorange	blaßgrün Gute Kerngrenzen	dunkelrotorange	dunkelrotorange Kerngrenzen nicht sichtbar	dunkelrotorange
Friedman IV	hellorange Undeutliche Kerngrenzen	hellorange	blaßgrün Sehr gute Kerngrenzen	orange	hellorange Undeutliche Kerngrenzen	hellorange
v. Bertalanffy			hellgelbgrün Sehr gute Kerngrenzen	orangerot	hellgelbgrün Untergrund heller als b)	orangerot

Tabelle 1: Ergebnisse der verschiedenen Färbungen an Ehrlich - Ascites - Tumorzellen

Erläuterungen der Färbevorgänge^{*}: Friedman I = keine Originalfarbstoffe; Friedman II - Originalfarbstoffe; Friedman III = wie I, nur Acridinorange statt Acridingelb in der gleichen Konzentration; Friedman IV = wie I, nur Mischung aus Acridinorange und Acridingelb zu gleichen Teilen; v. Bertalanffy = Originalfärbvorschrift der Acridinorange-Fluorochromierung nach v. Bertalanffy.

^{**} Erläuterungen der Eindeckmedien: a = "glycerin compound" nach Friedman; b = pH 8.0 - Pufferlösung bei den 4 Färbungen nach Friedman, bzw. pH 6.0 - Pufferlösung bei Färbung nach v. Bertalanffy; c = reines Glycerin, ohne Farbstoff- und Pufferzusatz

* vgl. Seite 11 - 14

** vgl. Seite 13 - 14

Die 5. Versuchsanordnung (S. 14), in der einzelne Punkte des Originalrezeptes nach F r i e d m a n kombiniert bzw. ausgelassen wurden, zeigte, daß bei ausschließlicher Anwendung von Berberinsulfat Kern und Plasma lindgrün fluoreszierten, während bei Akridingelb eher ein blau-grüner Fluoreszenzfarbton auftrat. Es war die Regel, daß die Fluoreszenzintensität des Kernes, subjektiv beurteilt, höher war als die des Plasmas.

Mit dieser 5. Versuchsanordnung schloß ich meine Untersuchungen über die F r i e d m a n - Färbung ab und beschäftigte mich in folgenden mit der Färbung nach v. B e r t a l a n f f y .

In der 6. Versuchsanordnung (S. 15) wurde unter Hinzunahme eines Zeitfaktors, der maximal 14 Tage betrug, die Vorbehandlung ungefärbter Zellausstriche im Vergleich zum Originalrezept abgewandelt.

Die Untersuchungsergebnisse sollten zeigen, auf welche Art ungefärbte Ausstriche am besten aufbewahrt würden, wenn der Färbevorgang nicht unmittelbar an die Herstellung und Fixierung der Ausstriche angeschlossen werden kann und die Präparate ungefärbt aufbewahrt werden müssen.

Wird der Färbevorgang noch am Tage der Präparatherstellung durchgeführt, so ist es nach meinen Untersuchungen nicht notwendig, die Ausstriche unmittelbar nach ihrer

Gewinnung in Äther-Alkohollösung zu fixieren, wie es von v. B e r t a l a n f f y angegeben wird. Handelt es sich nur um eine so kurze Zeitspanne bis zur Färbung, könnten nach meiner Erfahrung sogar der Fixierungsprozeß ausgelassen und die luftgetrockneten Ausstriche direkt in die absteigende Alkoholreihe eingestellt werden.

Qualitativ zeigten die noch am Herstellungstag fluoro-chromierten Ausstriche trotz verschiedener Vorbehandlung (s. Versuchsanordnung 6, Punkt a - d, S. 15) keine Unterschiede im Vergleich mit den nach Originalrezept von v. B e r t a l a n f f y gefärbten Präparaten.

Andere Ergebnisse erhielt ich, wenn die Ausstriche über 14 Tage bei Zimmertemperatur ungefärbt aufbewahrt worden waren und erst nach diesem Zeitraum die Fluorochromierung erfolgte.

Die Versuchsanordnung bei der jeweils 2 beschickte Objektträger mit Glyzerin bedeckt aufeinander gelegt aufbewahrt wurden (Punkte g und h, S. 15) stellte sich als vollkommen unbrauchbar heraus. Das fluoreszenzmikroskopische Bild zeigte gelbgrün fluoreszierende Zellkerne, das Cytoplasma war im überwiegenden Anteil der Versuche überhaupt nicht fluorochromiert worden. Gelegentlich fand sich blaßgrün fluoreszierendes Cytoplasma, die typische Orangerot-Fluoreszenz dieser Zellanteile wurde in keinem Fall gesehen.

Im Vergleich zu den frisch gefärbten Ausstrichen fielen bei Versuchsanordnung 6, Punkt e und f (S. 15), an den gefärbten Zellen gelegentlich regressive Zellveränderungen

unterschiedlichen Ausmaßes auf. Vakuolenbildungen innerhalb des Cytoplasmas und stechapfelförmige Schrumpfungen der Zellen wurden gesehen. Ferner war die Fluoreszenzintensität von Kern und Plasma nicht so hoch wie bei frisch gefärbten Ausstrichen. Die Metachromasie war in 90 % der Untersuchungen noch deutlich nachweisbar, die Beurteilung morphologischer Merkmale der Zellen gut möglich.

Bei ca. 10 % der Ausstriche wurde eine Metachromasie vermißt. Zellkerne und Plasma fluoreszierten orangefarben, so daß diese Präparate als vollkommen unbrauchbar angesehen werden mußten.

Bei der Versuchsanordnung 7 (S. 16) stellte sich heraus, daß Eindeckung der fluorochromierten Ausstriche mit reinem doppelt destillierten Glyzerin im Vergleich zur Puffereindeckung bei der Färbung nach v. B e r t a - l a n f f y nur Nachteile mit sich brachte. Glyzerin als Einschlußmittel bewirkte folgendes:

- 1.) Der gesamte Untergrund im mikroskopischen Bild wurde aufgehellt und damit der Farbkontrast zwischen fluorochromierten Zellen und Untergrund nivelliert.
- 2.) Es erfolgte auch innerhalb der fluorochromierten Zellen selbst eine Veränderung: Die Zellen erschienen wie mit einem Schleier überdeckt, so daß die Kernabgrenzungen gegenüber dem Cytoplasma und die Zellgrenzen undeutlicher wurden.

Vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Haltbarkeit bereits fluorochromierter Zellsuspensionen wurden in der 8. Versuchsanordnung (S. 16) vorgenommen. Qualitative Unterschiede waren bei den bei Zimmertemperatur im abgedunkelten Raum als auch bei im Kühlschrank bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ gelagerten, gefärbten Präparaten nach Ablauf von 14 Tagen nicht festzustellen. Einzelne regressive Zellveränderungen (leichte Schrumpfung des Cytoplasmas) konnten in beiden Untersuchungsreihen im gleichen Ausmaß beobachtet werden.

Bekanntlich sind fluorochromierte Ausstriche nicht unbegrenzte Zeit haltbar. Bis zu 14 Tagen ist eine Aufbewahrung mit guten Ergebnissen möglich, wie o.a. Untersuchungen zeigten.

In der Versuchsanordnung 9 (S. 16) wurde die Güte der Umfärbung nach P a p a n i c o l a o u und mit Haematoxylin-Eosin geprüft. Die Ergebnisse waren mit beiden Methoden zufriedenstellend. Bei der P a p a n i c o l a o u - Färbung fanden sich rotblaue bis tiefdunkelviolette Zellkerne bei blaßblauem bis -rotem Cytoplasma. Haematoxylin-Eosin bewirkte blauviolette Zellkerne und in verschiedenen Rottönen angefärbtes Cytoplasma.

DISKUSSION

Bei der Nachuntersuchung der von F r i e d m a n und von v. B e r t a l a n f f y angegebenen Färbemethoden konnten die von F r i e d m a n beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der Anfärbbarkeit der Zellen weder mit den angegebenen Firmenfarbstoffen noch mit solchen anderer Hersteller reproduziert werden. In keinem Fall zeigte sich eine isolierte Rot- oder Orangefärbung der Cytoplasmastrukturen. Dagegen wurden in den Präparaten an Kern und Cytoplasma gleiche Fluoreszenzfarben gefunden, die sich allerdings meist durch verschiedene Fluoreszenzintensitäten unterschieden.

Vermutlich enthielten die von F r i e d m a n verwendeten Farbchargen geringe Mengen von Acridinorange, da bei Mischung von Acridingelb mit Acridinorange Anfärbungen der Zellen zu beobachten waren, die denen in F r i e d m a n ' s Veröffentlichung angegebenen eher entsprachen.

Aus der Nichtreproduzierbarkeit der F r i e d m a n ' schen Färbemethode, die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen wurde, ist die Forderung abzuleiten, daß detaillierte Angaben über die verwendeten Farbstoffe gegeben werden sollten, was F r i e d m a n in seiner Arbeit nicht getan hat. Eine Kontrolle des Reinheitsgrades verwendeter Farbstoffe erscheint unerlässlich, wenn die Reproduzierbarkeit biologischer Färbemethoden gewährleistet sein soll.

Bekanntlich sind käufliche Farbstoffe nicht selten mit organischen oder anorganischen Bestandteilen verunreinigt. Der Salz- und Wassergehalt schwankt ebenso wie die Farbstoffkonzentration im kommerziellen Farbstoffpulver ganz erheblich. Auch fallen verschiedene Herstellungschargen einer einzigen Firma unterschiedlich aus. Der Gehalt des Farbstoffes an Farbstoffhomologen und -isomeren differiert ebenfalls bei den einzelnen Herstellungsprozessen.

Die Auseinandersetzung mit dieser Problematik erfordert gesonderte Untersuchungen, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würden. Diese müßten sich im einzelnen, wie es H o r o b i n (1969) gefordert hat, u. a. mit der Spektralphotometrie, Elektrophorese, chromatographischen Analyse und Aussalzung von kommerziellen Farbstoffen befassen.

Die Anwendung des empfohlenen Farbstoffgemisches "glycerin compound" als Eindeckmittel, zeigt nicht allein aufgrund seines zeitraubenden Ansatzes Nachteile, sondern ist mit besserem Ergebnis durch Eindeckung mit Pufferlösung ohne Farbstoffzusatz zu ersetzen.

Bei der Suche nach der bestmöglichen Aufbewahrung der frischen Ausstriche bis zur Acridinorange-Fluorochromierung nach v. B e r t a l a n f y fanden sich bei allen Präparaten, die noch am gleichen Tage gefärbt wurden, gleich gute Ergebnisse, unabhängig davon, ob eine Äther-Alkoholfixation vorangegangen war oder die Ausstriche lediglich

luftgetrocknet worden waren. In allen Fällen war die von v. B e r t a l a n f f y beschriebene Rot- Grün-fluoreszenz der Tumorzellen deutlich vorhanden. Ist eine unmittelbare Fluorochromierung der Präparate aus technischen Gründen nicht möglich, so sollten die beschickten Objektträger luftgetrocknet bis zur Acridinorangefärbung aufbewahrt werden. Selbst bei lufttrockener Lagerung der Objektträger bis zu 14 Tagen vor dem Fluorochromierungsvorgang konnte in der überwiegenden Zahl der Fälle sehr gute, farbkraftige, metachromatische Fluoreszenz der Tumorzellen gewonnen werden. Warum in einzelnen Fällen die metachromatische Eigenschaft des Acridinorange vermißt wurde, kann zunächst nur vermutet werden. Möglicherweise hatte die Autolyse der Zellen bereits so starke Ausmaße erreicht, daß eine Depolymerisierung der Kern - DNS bereits erfolgt war und Acridinorange daher auch von diesen Zellstrukturen gebunden werden konnte. Für diese Vermutung spricht, daß diese Beobachtungen nur an Sektionsgut, d.h. an Leichenpräparaten *) gemacht wurden und nicht an frischen Ascites-Ausstrichen beim Ascitestumor der Maus.

Als unzweckmäßig erwies sich die längere Aufbewahrung der ungefärbten Ausstriche in Glyzerin. Offenbar bewirkt Glyzerin Veränderungen an den ribonnucleinsäurehaltigen Strukturen des Cytoplasmas, so daß Acridin-

*) Früheste Gewinnung nach 18 Stunden, in den meisten Fällen jedoch 24 - 40 Stunden nach Todeseintritt.

orange nicht mehr gespeichert werden kann. Diese Aussage stützt sich auf die Beobachtung, daß bei Aufbewahrung mit Glycerin bei der nachfolgenden Fluorochromierung in keinem Fall rot- oder orangefluoreszierendes Cytoplasma der Tumorzellen gefunden wurde. Ayre und Dakin (1946) empfehlen dagegen die Aufbewahrung der Ausstriche vor einer Papanicolaou-Färbung in Glycerin, ohne daß Vorteile hieraus abgeleitet werden könnten.

Die Verwendung von Glycerin als Eindeckmittel nach der Acridinorange-Fluorochromierung hat sich, wie auch schon bei der Friedman-Färbung erwähnt, nicht als zweckmäßig erwiesen. Es sollte sogar vom Gebrauch von Glycerin abgeraten und die Eindeckung mit Pufferlösung, wie sie v. Bertalanffy angibt, vorgezogen werden. Durch die Anwendung von Glycerin wird der Untergrund so sehr aufgehellert, daß die gefärbten Zellen sich nicht scharf und kontrastreich abheben.

Aufgrund der Untersuchungen hinsichtlich Haltbarkeit und Aufbewahrung acridinorangegefärbter Präparate erscheint es nicht erforderlich, die bereits fluorochromierten Ausstriche im Kühlschrank aufzubewahren. Der fortschreitende Autolysevorgang wird offenbar durch die Fluorochromierung blockiert, wenn auch der Wasserverlust aus den Zellen trotz Versiegelung der Deckgläser nicht dauerhaft aufgehalten werden kann, so daß Zellschrumpfungen und Vakuolenbildungen im Cytoplasma

auftreten können.

Um das Nachlassen der Fluoreszenzintensität zu verzögern, hat es sich, wie die Untersuchungen zeigten, bewährt, die gefärbten Ausstriche nicht der direkten Lichteinwirkung auszusetzen und sie im abgedunkelten Raum bei Zimmertemperatur aufzubewahren.

Der eigentliche Nachteil der Acridinorange-Färbung besteht darin, daß keine Dauerpräparate hergestellt werden können. Aus diesem Grund wurden unter verschiedenen äußeren Bedingungen aufbewahrte, acridinorange-fluorochromierte Ausstriche hinsichtlich der Möglichkeit einer Umfärbung nach dem P a p a n i c o l a o u - Verfahren und mit Haematoxylin-Eosin untersucht. Bei bis zu 14 Tagen nach der v. B e r t a l a n f f y - Fluorochromierung sowohl im Kühlschrank als auch bei Zimmertemperatur aufbewahrten Ausstrichpräparaten war die Qualität der Umfärbung in beiden Fällen gut, die Morphologie der Zellen unverändert, so daß auf diese Weise "Dauerpräparate" zur Dokumentation gewonnen werden können.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Brauchbarkeit der Färbemethode nach F r i e d -
m a n für cytologische Zwecke im Vergleich zur v. B e r -
t a l a n f f y - Routinefärbung untersucht. Im Zusammen-
hang mit dieser Versuchsreihe wurden weitere Probleme wie
Vorbehandlung ungefärbter Ausstriche, verschiedene Eindeck-
mittel, bestmögliche Aufbewahrung fluorochromierter Präpa-
rate und Möglichkeiten einer Umfärbung nach P a p a n i c o -
l a o u und mit Haematoxylin-Eosin zur Gewinnung von
"Dauerpräparaten" zur Dokumentation kontrolliert.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1.) Die F r i e d m a n - Färbetechnik ist weder mit den angegebenen Firmenfarbstoffen noch mit solchen anderer Hersteller reproduzierbar.
- 2.) Erst durch Zusatz von Acridinorange zu dem von F r i e d m a n angegebenen Farbstoff und durch Abwandlung des Eindeckmittels konnten diagnostisch verwertbare Ergebnisse erzielt werden.
- 3.) Die Färbemethode nach v. B e r t a l a n f f y ist reproduzierbar.
- 4.) Eine Lufttrocknung ungefärbter Ausstriche als Vorbehandlung vor einer Fluorochromierung nach v. B e r t a l a n f f y ist ausreichend. Es sollten jedoch nicht mehr als 14 Tage bis zur Färbung verstreichen, da mit zunehmenden regressiven Zellveränderungen gerechnet werden muß.
- 5.) Glyzerin ist als Einschlußmittel bei der v. B e r t a l a n f f y - Färbetechnik nicht geeignet.
- 6.) Die beste Aufbewahrungsmöglichkeit nach v. B e r t a l a n f f y gefärbter Ausstriche ist bei Zimmertemperatur im abgedunkelten Raum.

Eine Lagerung im Kühlschrank ist nicht erforderlich.

- 7.) Bis 14 Tage nach der Fluorochromierung nach v. B e r t a l a n f f y ist eine Umfärbung der Ausstriche nach P a p a n i c o l a o u und mit Haematoxylin-Eosin mit gutem Ergebnis möglich.

Literaturverzeichnis

1. Armstrong, J.A. Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence.
Exp. Cell Res. 11, 641 (1956)

2. Ayre, J.E. and E. Dakin Cervical cytology tests in cancer diagnosis; glycerine technique of mailing.
Canad. M. A. J. 54, 489 (1946)

3. Bertalanffy, L. v., F. Masin and M. Masin Use of acridine orange fluorescence technique in exfoliative cytology.
Science 124, 1024 (1956)

A new and rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by fluorescence microscopy.
Cancer N. Y. 11, 873 (1958)

4. Bertalanffy, L. v. and J. Bickis Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy.
J. Histochem. Cytochem. 4, 481 (1956)

5. Bertalanffy, F. D. Fluorescence microscope method for detection of pulmonary malignancies.
Canad. med. Ass. J. 83, 211 (1960)

6. Bertalanffy, F. D. Fluorescence microscopy for cytodagnosis of cancer.
Postgrad. Med. 28, 627 (1960)

7. Bertalanffy, F. D. Acridine orange fluorescence in cytology.
Canad. med. Ass. J. 85, 662 (1961)

8. Bontke, E., G. Kern und N. Schümmelfeder Die Akridinorange-Fluorochromierung in der gynäkologischen Cytodiagnostik.
Geburtsh. und Frauenheilkunde 20, 24 (1960)

9. Culling, F. A. and P. S. Vassar Acridine orange fluorescence in cytology of the cervix.
Canad. med. Ass. J. 85, 142 (1961)

10. Dart, L.H. and T. R. Turner Fluorescence mikroskopy in exfoliative cytology.
Lab. Invest. 8, 1513 (1959)

11. Flegel, H. Zur Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie in der Medizin.
Wiss. Z. d. Friedrich-Schiller-Univ. Jena, math.-naturwiss. R. 3, 475 (1953/54)

12. Fischl, V. und E. Schwenk Fluoreszenzmikroskopie als chemotherapeutische Forschungsmethode
Klin.Wschr. 11, 1114 (1932)

13. Friedman, H. P. jr. Use of ultraviolet light and fluorescent dyes in detection of urine cancer by vaginal smear.
Amer. J. Obstet. Gynec. 59, 852 (1950)
14. Fuhrmann, K. Die Supravitalfluorochromierung des Scheidenabstriches.
Archiv f. Gynäk. 185, 624 (1955)
15. Hagemann, P. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Leprabakterien in Nasenschleim und im Blut.
Dtsch. med. Wschr. 63, 514 (1937)
16. Haitinger, M. Die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden II/3/1, 3307
Urban & Schwarzenberg Wien 1934
17. Haitinger, M. Fluoreszenzmikroskopie 2. Aufl. Akademische Verlagsgesellschaft, Geest und Portig KG Leipzig 1959
18. Hamperl, H. Fluoreszenzmikroskopie.
Münch. med. Wschr. 35, 1121 (1955)
19. Hamperl, H. und Über Fluoreszenzmikroskopie.
N. Schümmelfeder Ciba Symposium 2, 2 (1961)
20. Harms, H. Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie.
Staufen Verlag 1965
21. Horobin, R. W. The impurities of biological dyes: their detection, removal, occurrence and histological significance - a review.
Histochem. J. I, 231 (1969)
22. Jansco, N. v. Beobachtung chemotherapeutischer Vorgänge im Fluoreszenzmikroskop.
Klin. Wschr. 11, 689 (1932)
23. Kern, G., Die Acridinorange-Fluorochromierung der Cytodiagnostik von Carcinoma in situ und Collumcarcinomen.
Schümmelfeder, N. Arch. Gynäk. 196, 394 (1961)
und E. Bontke
24. Köhler, A. Mikrophotographische Untersuchungen mit ultravioletem Licht.
Z. wiss. Mikr. 21, 273 (1904)
25. Liu, W. Fluorescence microscopy in exfoliative cytology.
Arch. Path. 71, 386 (1961)
26. Meyer-Arendt, J., Zur quantitativen Messung in der Fluoreszenzmikroskopie.
E. Rottmann und Klin. Wschr. 33, 31 (1955)
H. A. v. Schweinitz
27. Mellors, R. C., A microfluorometric method for the detection of cancer cells in smears of exfoliated cells.
A. Glasman and Cancer N. Y. 5, 458 (1952)
G. N. Papanicolaou

28. Schümmelfeder, N. Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Acridinorange. Naturwissenschaften 35, 346 (1948)
29. Schümmelfeder, N. Über Beziehungen zwischen Stoffwechselaktivität und Acridinorange-speicherung von Zellen. Naturwissenschaften 36, 58 (1949)
30. Schümmelfeder, N. Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle. Virchows Arch. 318, 119 (1950)
31. Schümmelfeder, N. Fluoreszenzmikroskopische Histochemie und Farbphotographie. Photograph. Wiss. 6, 19 (1957)
32. Schümmelfeder, N., K. J. Ebschner und R. E. Krogh Die Grundlage der differentiellen Fluorochromierung von Ribonucleinsäure mit Acridinorange. Naturwissenschaften 17, 467 (1957)
33. Schümmelfeder, N. Histochemical significance of the polychromatic fluorescence induced in tissues stained with acridine orange. J. Histochem. & Cytochem. 6, 392 (1958)
34. Schümmelfeder, N. Zur histochemischen Bedeutung der Fluoreszenzmetachromasie des Acridinorange. Acta histochem. Suppl. 1, 148 (1958)
35. Schümmelfeder, N., E. Krogh und K. J. Ebschner Färbungsanalysen zur Acridinorange-Fluorochromierung. Vergleichende histochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Kleinhirn der Maus mit Acridinorange. Histochemie 1, 1 (1958)
36. Schümmelfeder, N. Die Acridinorange-Fluorochromierung in der cytologischen Krebsdiagnostik. Ther. Berichte Bayer 6, 195 (1962)
37. Schümmelfeder, N., G. Kern und E. Kern-Bontke Die Acridinorange-Fluorochromierung in der gynäkologischen Zytodiagnostik bösartiger Tumoren. Mitt. Dienst GBK 2, 482 (1962)
38. Stübel, H. Die Fluoreszenz tierischer Gewebe im ultravioletten Licht. Pflügers Arch. Physiol. 142, 1 (1911)
39. Strugger, S. Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jen. Z. Med. Naturw. 73, 97 (1941)

40. Strugger, S. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie.
M. und H. Schaper Hannover 1949
41. Sussman, W. Detection of gynecologic cancer by fluorescence microscopy.
Obstet. and Gynec. 13, 273 (1959)
42. Umicker, W.,
L. Pickle and
B. White Fluorescence microscopy in exfoliative cytology.
Brit. J. Cancer 13, 398 (1959)
43. Weissmann, Ch.
und A. Gilgen Die Fluorochromierung lebender Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen mit Akridinorange und der Einfluß der Glykolyse auf das Verhalten der Zelle.
Z. Zellforsch. 44, 292 (1956)
44. Wellmann, K.F. Kritische Bemerkungen zur Acridinorange-Fluorochromierung in der zytologischen Krebsdiagnostik.
Mediz. Welt 40, 2100 (1962)
45. Wellmann, K.F. Zur Bewertung der Acridinorange-Fluorochromierung in der Zytodiagnostik des Krebses.
Münch. med. Wschr. 31, 1428 (1962)
46. Wellmann, K.F. Fluorescence microscopic study of normal and diseased squamous epithelium in tissue sections from the uterine cervix.
Surgery 114, 617 (1962)
47. Wellmann, K. F.,
M. A. Mc Dermott
and E. K. Gray An evaluation of acridine-orange fluorescence microscopy in cytology.
Acta cytol. 7, 2 (1963)
48. Wied, G. L., M. D.,
and José J.
Mangano, M. D. A comparative study of the Papanicolaou-technic and the acridine-orange fluorescence method.
Acta cytol. 6, 6 (1962)
49. Willschke, A. Über die Fluoreszenz der Chlorophyllkomponenten.
Z. wiss. Mikr. 31, 338 (1914)
50. Zanker, V. Über den Nachweis definierter reversibler Assoziat ("reversibler Polymerisate") des Akridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzlösungen in wäßriger Lösung.
Zschr. Physik. Chemie 199, 228 (1952)

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor
S c h ü m m e l f e d e r †, danke ich für die
Themenstellung, Anleitung und Beratung bei der
experimentellen Durchführung und Zusammenstellung
der Ergebnisse.

Herrn Professor P i c k e r t gilt mein herz-
licher Dank für die Übernahme und Unterstützung
bei der Fertigstellung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 8. Juli 1936 wurde ich als Tochter des aktiven Offiziers Werner Heucke und seiner Ehefrau Annemarie geb. Ebel in Magdeburg geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Dresden und Jüterbog, wo ich ab Herbst 1942 die Volksschule besuchte. Nach mehrfachem, kriegsbedingtem Ortswechsel übersiedelten wir 1947 nach Goslar/Harz, wo ich im gleichen Jahr die Aufnahmeprüfung zur Oberschule bestand. Dort legte ich 1956 auch die Reifeprüfung ab. Nach anfänglichem, zahnmedizinischem Studium in Hamburg wechselte ich zur Humanmedizin über und bestand im Sommersemester 1959 das Physikum in Göttingen. Nach meiner Heirat im Januar 1962 in Berlin folgte ich im gleichen Jahr meinem Mann, Dr. med. Dieter Krause, nach Köln, wo ich 1963 das medizinische Staatsexamen ablegte. Von November 1963 bis Dezember 1964 arbeitete ich am Pathologischen Institut der Universität zu Köln, wo mir Herr Professor Schümmelfeder das Thema meiner Doktorarbeit stellte und diese im wesentlichen abgeschlossen wurde. Anfang des Jahres 1965 ging ich nach Berlin, wo mein Mann bereits seit einiger Zeit an der Orthopädischen Klinik unter Professor Witt arbeitete. Meine Ausbildung als Medizinalassistentin wurde hier in der Chirurgie (St. Gertraudenhospital) und Gynäkologie (Städtisches Wenckebach-Krankenhaus) fortgesetzt, jedoch im Oktober desselben Jahres wegen einer infektiösen Hepatitis unterbrochen. Erst im Mai 1966 konnte ich meine Medizinal-Assistententätigkeit an der II. Inneren Klinik des Städtischen Krankenhauses Spandau unter Herrn Professor Pickert fortsetzen, der nach dem plötzlichen Tod meines verehrten Doktorvaters die Weiterführung meiner Promotionsarbeit unterstützte. Im November 1966 erhielt ich die ärztliche Approbation und begann meine fachinternistische Ausbildungszeit an dieser Klinik.

